



Metody sledování komplementového systému

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Komplement

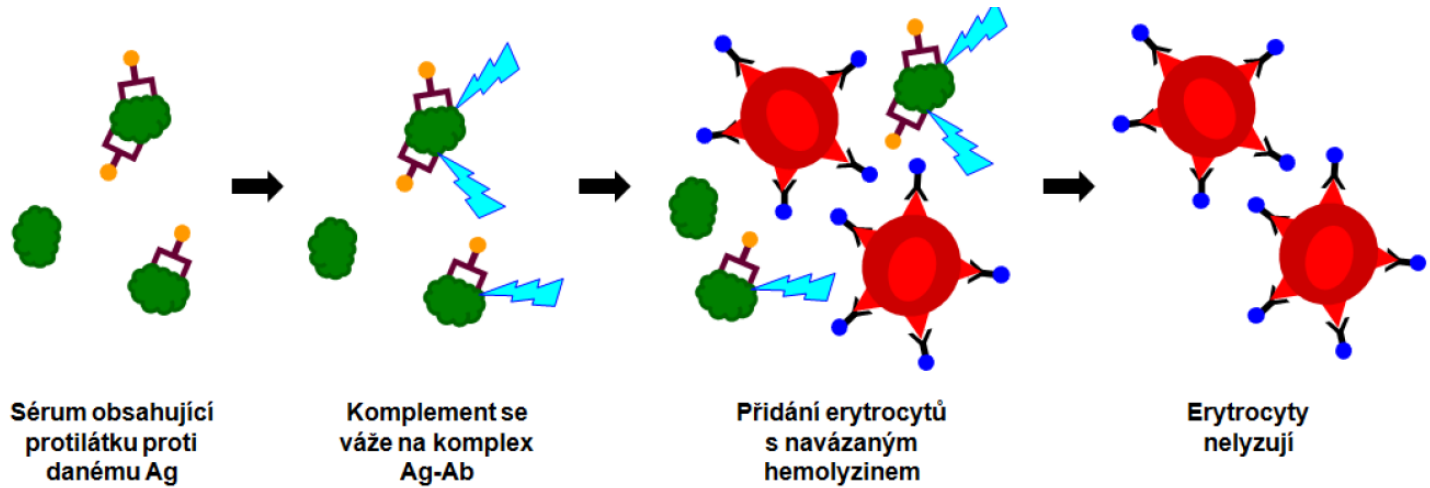
- Spouštěč – navázané protilátky, LPS
- Aktivace jednotlivých složek odštěpením krátkého bílkovinného řetězce
- Membranolytické, opsonizační, chemotaktické
- Klasická, alternativní lektinová dráha

- Stanovení jednotlivých složek je problematické
 - Krátký poločas rozpadu
 - Nízké koncentrace v séru
- C3, C4 – ELISA, radiální difúze

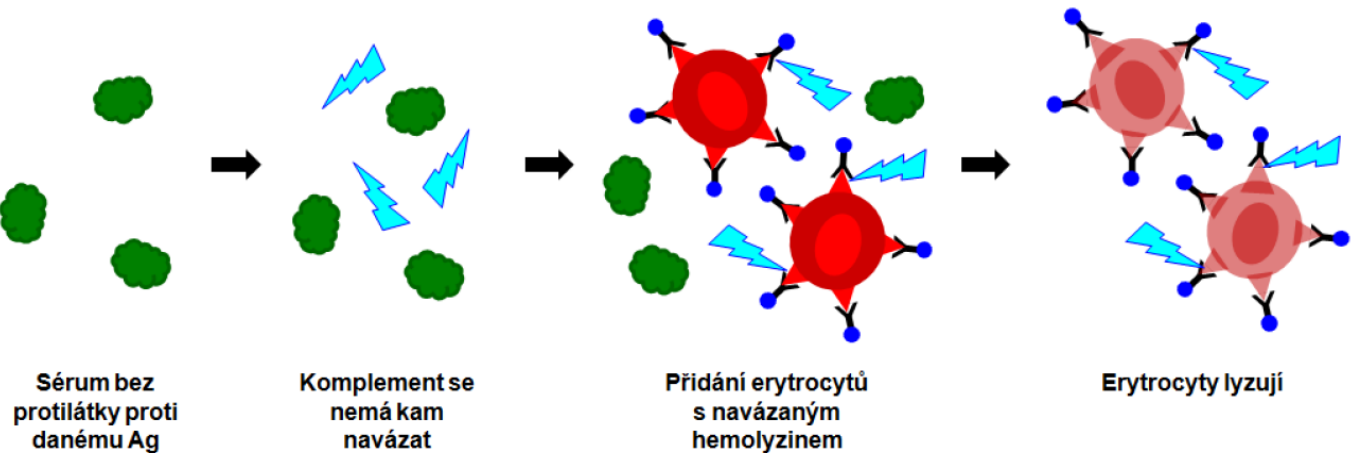
Komplement fixační reakce


- Sledujeme přítomnost protilátky proti danému antigenu

Pozitivní



Negativní





VIII. Úloha – Bioluminiscenční stanovení bakteriolytické aktivity komplementu

Princip

Založeno na měření světelné emise (bioluminiscence), která je výsledkem reakce:



Bakteriální luciferáza (Lux) katalyzuje oxidaci aldehydu s dlouhým řetězcem a redukovaného flavin mononukleotidu (luciferin) za současného vzniku jejich oxidovaných forem a produkce světla s maximem při vlnové délce 490 nm. Pro tvorbu luciferinu je zapotřebí velkého množství ATP, který je produkován pouze živými buňkami - míra bioluminiscence je tedy přímo úměrná viabilitě bakterií.

Čím větší je aktivita komplementu, tím více bakterií zlyzuje a tudíž je nižší bioluminiscence

Chemikálie a roztoky

- **Suspenze bakterií** (*Escherichia coli* K12 s plasmidem pEGFPluxABCDEamp) v PBS (pH 7), koncentrace cca 100 000 bakterií/jamku
- **HIS** (*Sigma Aldrich, CZ*) tepelně inaktivované fetální bovinní sérum
- **EGTA** (*EthyleneGlykol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N'-Tetraacetic Acid*) (100 mM)
- Měřený vzorek – **rybí plazma** (pstruh)

Přístroje a pomůcky

- Luminometr
- Šablona s jednorázovými stripy

Postup

1. Do dvojice se připraví **2 zkumavky s HIS:**
 - pro celkovou aktivitu komplementu: **80 μ l HIS + 120 μ l PBS**
(poměr 2 : 3)
 - pro alternativní cestu: **80 μ l HIS + 40 μ l PBS + 80 μ l EGTA**
(poměr 2 : 1 : 2)

2. Do dvojice si připravíte **2 zkumavky s rybí plazmou (vzorek):**
 - pro celkovou aktivitu komplementu: **40 μ l plazmy + 60 μ l PBS**
(poměr 2 : 3)
 - pro alternativní cestu: **40 μ l plazmy + 20 μ l PBS + 40 μ l EGTA**
(poměr 2 : 1 : 2)

Postup

3. Pipetovat na desku v pořadí dle následujícího schématu (zleva doprava – viz poslední řádek):

		[μl]				
		Vzorek s PBS	Vzorek s EGTA	HIS s PBS	HIS s EGTA	Suspenze bakterií
Celková aktivita	Blank K	-	-	50	-	50
	K 1	10	-	40	-	50
	K 2	20	-	30	-	50
	K 3	40	-	10	-	50
Alternativní dráha	Blank A	-	-	-	50	50
	A 1	-	10	-	40	50
	A 2	-	20	-	30	50
	A 3	-	40	-	10	50

pořadí pipetování na destičku: 1. 2. 3. 4. 5.

Postup

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Celková	Blank K	A												
	K 1	B												
	K 2	C												
	K 3	D												
Alternativní	Blank A	E												
	A 1	F												
	A 2	G												
	A 3	H												
			<i>dv. 1</i>	<i>dv. 2</i>	<i>dv. 3</i>	<i>dv. 4</i>	<i>dv. 5</i>	<i>dv. 6</i>	<i>dv. 7</i>	<i>dv. 8</i>	<i>dv. 9</i>	<i>d. 10</i>	<i>d. 11</i>	<i>d. 12</i>

4. Ihned po přidání bakteriální suspenze měříme v luminometru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě
 - Interval: 10 s
 - Počet cyklů: 720

Výstup

2 grafy závislosti bioluminiscence na čase:

- Celková aktivita komplementu
- Alternativní dráha

2 grafy závislosti viability bakterií (2 hodiny) po začátku měření (%) na množství plazmy v μl

- Celková aktivita komplementu
- Alternativní dráha

IC50 tedy množství plazmy, které je potřebné k usmrcení 50 % bakterií během dvou hodin měření - 1 U (unit) komplementu

- Celková aktivita komplementu
- Alternativní dráha

Celková aktivita komplementu (U/ml)

Aktivita alternativní cesty (U/ml)